

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月12日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591073

研究課題名（和文） 新規脳梗塞治療戦略としての選択的 VEGF 抑制療法の確立

研究課題名（英文） Establishment of selective VEGF inhibition treatment as a novel therapeutic strategy against ischemic stroke

研究代表者

下畑 享良（SHIMOHATA TAKAYOSHI）

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：60361911

研究成果の概要（和文）：

血管内皮細胞増殖因子（VEGF）は血液脳関門の破綻に関与するが、血栓溶解療法後の脳出血に関与するかは不明である。我々は VEGF シグナルカスケードの抑制が tPA 療法後の脳出血を軽減する可能性を考えた。塞栓性中大脳動脈閉塞モデルに対し、虚血 4 時間後に tPA を投与し、虚血 24 時間に VEGF シグナルカスケード活性化と出血を評価した。抗 VEGF 抗体はこれらを抑制した。VEGF は有力な治療標的分子である。

研究成果の概要（英文）：

Vascular endothelial growth factor (VEGF), might be associated with the blood-brain barrier (BBB) disruption after focal cerebral ischemia: however, it remains unknown whether hemorrhagic transformation (HT) after tissue plasminogen activator (tPA) treatment is related to the activation of VEGF signaling pathway in BBB. Here, we hypothesized that inhibition of VEGF signaling pathway can attenuate HT after tPA treatment. Rats subjected to thromboembolic focal cerebral ischemia were assigned to groups treated with tPA at 1 h or 4 h after ischemia. Anti-VEGF neutralizing antibody or control antibody was administered simultaneously with tPA. At 24 h after ischemia, we evaluated the effects of the antibody on the VEGF signal cascades and HT. Delayed tPA treatment at 4 h after ischemia promoted VEGF signal activation and HT. Combination treatment with tPA and the anti-VEGF neutralizing antibody significantly attenuated these changes. Inhibition of VEGF signaling pathway may be a promising therapeutic strategy for attenuating HT after tPA treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、脳の動脈が血栓により閉塞することにより発症する。よってこの血栓を溶かし、脳血流を再開することができれば脳梗塞による症状が改善するのではないかという考えから始まった治療が「血栓溶解療法」である。この治療に使用する薬剤が、組織型プラスミノゲン・アクチベーター (t-PA) である。t-PA は非常に有用性の高い薬剤であるが、現状では全脳梗塞患者の 5%未満しか t-PA による治療による恩恵を受けていない。この原因としては、t-PA は発症から 3 時間以内の脳梗塞患者にしか適応がないことがあげられる。この理由は一定時間を超えて t-PA を使用すると脳出血を合併する頻度が高くなるためである。これは血管閉塞と t-PA により血液脳関門が破綻するためと考えられている。

t-PA 療法後の脳出血のメカニズムとしては、脳梗塞後に活性化されるタンパク分解酵素であるマトリックスプロテアーゼ 9 (MMP-9) 等による細胞外マトリックスの分解や、血管内皮細胞や周皮細胞の障害が考えられる。

2. 研究の目的

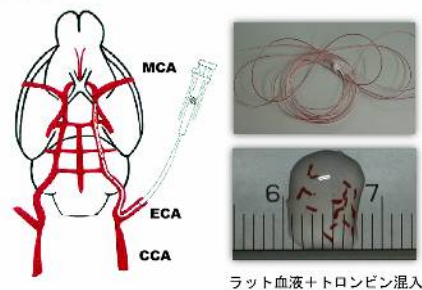
t-PA 療法後の脳出血を抑制する血管保護薬を同定すること。

3. 研究の方法

ヒトの脳梗塞にみられる t-PA 治療後の脳出血を再現するラット脳塞栓モデルを使用する (Okubo ら。図 1)。つぎにこのモデルを使用して、t-PA 治療後に血管に発現し、MMP-9 を誘導する標的分子を同定する。そしてこの標的分子を除去する薬剤が、血管を保護しうるかどうか検討する。

より具体的には、動物モデルとしては、日本医大より 2007 年に報告されたラット脳塞栓モデルを使用する。ラット血液にトロンピンを混入し作成した自家血血栓をカテーテルから中大脳動脈に注入し、閉塞させる局所脳虚血モデルである。そして超音波にて脳表血流が血管閉塞前の 50%未満に低下したラットのみ使用し、血管閉塞の 1 時間後ないし 4 時間後に t-PA を静脈投与した。本モデルでは t-PA 投与を 4 時間後に行うと MMP-9 の活性化と脳血管を構成する細胞外マトリックスであるタイプ IV コラーゲンの分解が生じ、その結果、脳出血を来すことが明らかになった。

図 1



4. 研究成果

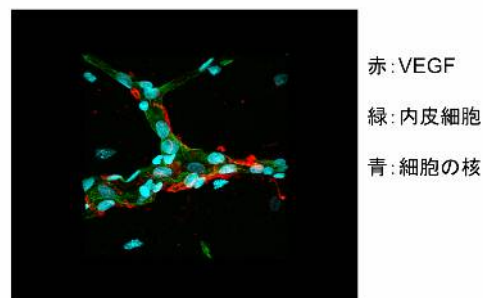
(1) 治療標的分子の同定

本モデルを用いて、種々の候補蛋白についての検討を行ったが、その中で血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) が脳梗塞周辺に強く発現することがわかり (図 2)、脳出血と関連する可能性が示唆された。

まず VEGF の発現を免疫染色で確認したところ、血管閉塞を行わないシャム手術では VEGF の発現は認めないが、血管閉塞を行うと脳血管に VEGF が発現するようになり、とくに t-PA を 4 時間で投与した群において強い発現がみられた。さらに VEGF の発現部位を二重染色により検討したが、VEGF は血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトが発現していた。一方、VEGF が結合し活性化されたと考えられるリン酸化 VEGF 受容体は周皮細胞においてのみ発現が認められた。

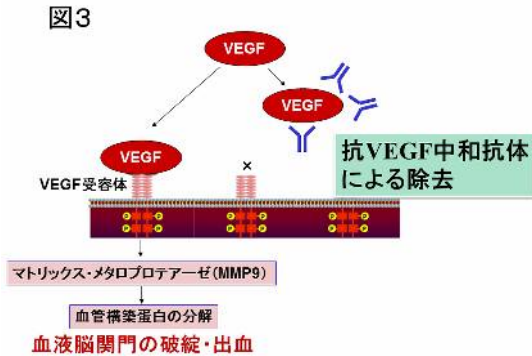
以上より治療可能時間を超えた t-PA 療法は、血液脳関門における VEGF シグナルの活性化を介して、MMP9 の活性化を引き起こし、その結果、血管構成蛋白が分解され血液脳関門の破綻を引き起こす可能性が示唆された。

図 2



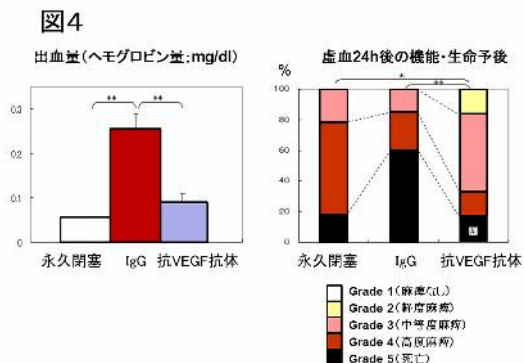
(2) VEGF 抑制療法

次に VEGF シグナルの抑制が脳出血の防止に有効であるか検討を行った. VEGF シグナル抑制の方法としては, 抗 VEGF 中和抗体による VEGF の除去, ならびに VEGF 受容体の活性化を抑制する VEGF 受容体阻害剤を使用した (図 3).



まずラット VEGF を中和する抗体として RB-222 を同定した. RB-222 は, tPA 投与後の MMP-9 の活性化を抑制した. この結果, RB-222 は血管を構成する type IV collagen の分解を抑制した.

さらに RB-222 が tPA 療法後の脳出血量を抑制できるか検討した. 脳出血は脳単位体積当たりのヘモグロビン量として計測した. RB-222 はコントロール抗体の投与と比較して有意に脳出血を抑制し, さらに機能予後・生命予後も有意に改善した (図 4). また同様の脳出血抑制効果は, VEGF 受容体の活性化を阻害する SU1498 の腹腔内投与でもみとめられた. 以上より, VEGF シグナルの抑制は, tPA 療法に伴う脳出血に対して有効な治療戦略となる可能性が示唆された.



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Kanazawa M, Igarashi H, Kawamura K, Takahashi T, Kakita A, Takahashi H, Nakada T, Nishizawa M, Shimohata T. Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment. J Cereb Blood Flow Metab. 査読有, Vol. 31, No.6, 2011, pp. 1461-1674,

② Kanazawa M, Kakita A, Igarashi H, Takahashi T, Kawamura K, Takahashi H, Nakada T, Nishizawa M, Shimohata T. Biochemical and histopathological alterations in TAR DNA-binding protein-43 after acute ischemic stroke in rats. J Neurochem. 査読有, Vol. 116, No.6, 2011, pp. 957-965,

[学会発表] (計 1 件)

下畑享良, 金澤雅人, 五十嵐博中, 高橋哲哉, 川村邦雄, 柿田明美, 高橋 均, 中田力, 西澤正豊. VEGF シグナル阻害は tPA による血栓溶解療法後の脳出血を抑制する. 日本神経学会学術集会, 2011年5月19日, 名古屋

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 免疫製剤を含む脳梗塞治療用医薬品組成物

発明者: 下畑享良

権利者: 新潟大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-174098

出願年月日: 平成 21 年 8 月 11 日

国内外の別: 国内

名称: 受容体シグナル伝達阻害剤を含む脳梗塞治療用医薬品組成物

発明者: 下畑享良

権利者: 新潟大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-174099

出願年月日: 平成 21 年 8 月 11 日

国内外の別: 国内

名称: 虚血性イベントの治療用医薬品組成物

発明者: 下畑享良

権利者: 新潟大学

種類: 特許協力条約 (PCT) に基づく国際出願

番号: N-ST005-10P-US

出願年月日：平成 22 年 7 月 27 日
国内外の別：外国

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.facebook.com/NiigataCBFM>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下畑 享良 (SHIMOHATA TAKAYOSHI)
新潟大学脳研究所・准教授
研究者番号：6 0 3 6 1 9 1 1

(2) 研究分担者

五十嵐 博中 (IGARASHI HIRONAKA)
新潟大学脳研究所・教授
研究者番号：2 0 2 3 1 1 2 8

高橋 哲哉 (TAKAHASHI TETSUYA)
新潟大学医歯学総合病院・助教
研究者番号：2 0 5 1 5 6 6 3